

CÁC CHẤT ỨC CHẾ PROTEINAZ (PIs) VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH ÉP TỪ LÁ CÂY THUỐC BỎNG (*KALANCHOE PINATA*)

ĐÀO THỊ THUÝ, HOÀNG THU HÀ,
PHẠM THỊ TRÂN CHÂU

Đại học quốc gia Hà Nội

Các proteinaz tham gia trong nhiều quá trình sống quan trọng, quá trình gây bệnh, quá trình viêm, quá trình lây nhiễm của nhiều vi khuẩn, virút... Do đó người ta đã và đang nghiên cứu sử dụng các chất ức chế proteinaz để điều trị các bệnh, trong đó proteinaz là yếu tố gây bệnh hoặc tham gia trong quá trình gây bệnh.

Lá cây thuốc bỏng thường được sử dụng để điều trị các vết bỏng, vết thương, mụn nhọt và một số bệnh nhiễm trùng khác [10]. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết lá bỏng có tác dụng ức chế sinh trưởng nhiều vi khuẩn khác nhau, trong đó có *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, là các vi khuẩn chủ yếu gây nhiễm trùng vết thương, vết mổ dễ dẫn đến hậu quả nghiêm trọng, và kháng với nhiều loại thuốc kháng sinh đang dùng.

Những năm gần đây đã có một số công bố tách chiết một số chất có hoạt tính sinh học từ một số loài thuộc chi *Kalanchoe* [1, 3, 5, 9], tuy nhiên chưa tìm thấy công trình nào nghiên cứu các chất ức chế proteinaz của chi này. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi về điều tra các PI ở một số cây thuốc [7], đã phát hiện được dịch ép lá thuốc bỏng (DE) có PI và cũng ức chế sinh trưởng của *Pseudomonas aeruginosa*. Vì vậy, công trình này nhằm tìm hiểu kỹ hơn về các PI và hoạt tính kháng *S. aureus* và *P. aeruginosa* của lá bỏng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Lá thuốc bỏng tươi gồm 3 loại khác nhau về hình thái, ký hiệu là K1, K2 và K3.

Thu mẫu lá bỏng: lá “bánh tẻ”, không quá già hoặc quá non. Lấy mẫu vào 8 giờ sáng, trời không mưa.

Chuẩn bị dịch ép (DE) từ lá bỏng: nghiền nhỏ mẫu lá, dùng vải màn vắt lấy nước, ly tâm thu dịch trong để phân tích, bảo quản ở - 20°C.

Các mẫu vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* (ST) do phòng thí nghiệm Vi sinh vật, bệnh viện Bạch Mai cung cấp, được phân lập từ mũ vết thương của bệnh nhân, ký hiệu ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST1M, ST2M và ST3M); *P. aeruginosa* được phân lập từ mũ vết thương bỏng.

Hoá chất: tripxin, kimotripxin, albumin tinh khiết của hãng Sigma. Cazein của hãng Kanto chemicals co., INC, Coomassie brilliant blue G-250 của hãng ICN Biomedicals, Inc (Đức). Cao thịt của hãng Merck (Đức), Peptone (Trung Quốc). Aga của hãng Merk (Đức). Màng lọc vô khuẩn Minisart 0,2 µm của hãng Sartorius. Các hoá chất khác đạt độ sạch phân tích.




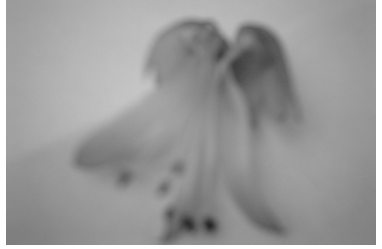
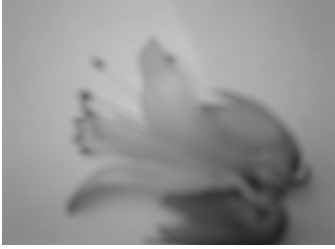




2. Phương pháp

+ Xác định hàm lượng chất khô tuyệt đối bằng cân Scaltex SMO 01.

+ Xác định protein theo phương pháp Bradford [2], dùng albumin huyết thanh bò làm chuẩn, đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm.

+ Xác định hoạt độ phân giải protein (PA) theo 2 phương pháp:

- Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với cơ chất cazein 0,1% giữ ở 35,5°C trong khoảng thời gian thích hợp, nhuộm bằng dung dịch amido đen 10B 0,1% trong axit axetic 7%. Đánh giá hoạt độ theo đường kính vòng phân giải.

		
		Lá và hoa K1: lá nhọn, dài, dày, răng cưa đều 2 mép lá, mặt trên lá xanh nhạt (hơi bạc), mặt dưới xanh thẫm. Cành hoa và hoa của K1. Dựa theo tài liệu của Phạm Hoàng Hộ [6], theo GS.TSKH. Nguyễn Nghĩa Thìn, định tên là <i>Kalanchoe daigremontiana</i> R. Ham & H. Perer.
		Lá K2: lá hơi tròn ở đầu, dày hơn K1, răng cưa mau hơn K1 ở hai mép lá, gân cuống lá có hai tai đối xứng hai bên.
		Lá K3: lá gần tròn, răng cưa rất thưa ở hai mép lá, lá mỏng hơn K1 và K2, màu xanh sẫm hơn K1, K2

- Phương pháp Ason cải tiến [8].

+ Xác định hoạt độ ức chế tripxin (TIA), kimotripxin (KIA), hoạt độ ức chế proteinaz vi khuẩn, cũng thực hiện theo 2 phương pháp trên như đã mô tả trong công trình trước [4]

+ Sắc ký qua cột Sephadex G-25: Cột có kích thước 2 x 90 cm, cân bằng với đệm Sorensen pH = 6,5, rút protein cũng bằng dung dịch đệm này.

+ Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường canh thang thường (g/l): pepton 10 g, cao thịt 10 g, NaCl 1 g; pH: 6,5. Để chuẩn bị môi trường rắn, thêm aga vào để đạt nồng độ 1,5%.

Tách proteinaz của vi khuẩn: cấy vi khuẩn vào môi trường dịch thể, lắc 200 vòng/phút ở 35°C, ly tâm loại bỏ tế bào, thu dịch trong. Thu chế phẩm proteinaz từ dịch môi trường bằng

cách kết tủa với axeton [4].

+ Thử tác dụng kháng khuẩn:

- Phương pháp khuếch tán: thêm 100 µl dịch vi khuẩn đã nuôi tăng sinh vào môi trường thạch thường đã đạt nhiệt độ gần 40°C, trộn đều, đổ ra đĩa thạch. Trên đĩa thạch có các giếng với đường kính 8mm, nhỏ 150 µl dung dịch nghiên cứu vào mỗi giếng. Để mẫu khuếch tán trong tủ lạnh 24 giờ, sau đó chuyển vào tủ ấm 35°C, sau 24 giờ đo vòng vô khuẩn. Hoạt độ kháng khuẩn được đánh giá theo hiệu số đường kính vòng vô khuẩn (D) và đường kính giếng (d). Hoạt độ (mm) = D-d.

- Phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng: i) chuẩn bị hỗn dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý (NMSL) để đạt 10⁸ vi khuẩn/ml, từ dung dịch này pha loãng tiếp thành các dung

dịch có 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 vi khuẩn/ml; ii) dung dịch nghiền cứu cũng pha loãng trong (NMSL); iii) Trộn hỗn dịch vi khuẩn 10^8 /ml với các dung dịch thuốc đã pha loãng, theo tỉ lệ 1:1 (sao cho đạt độ pha loãng 2, 4, 8, 16 lần so với ban đầu). Giữ 37°C, sau các khoảng thời gian khác nhau (2, 6, 24 giờ), lấy mẫu, dùng loop định lượng cấy trên môi trường thạch. Các mẫu hỗn dịch vi khuẩn chuẩn bị ở bước (ii) cũng giữ ở 37°C để làm chuẩn. iii) Giữ tất cả các đĩa thạch ở 37°C, sau 24 giờ đọc kết quả.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân tích thành phần các loại lá thuốc bỏng (bảng 1)

Kết quả trên bảng 1 cho thấy hàm lượng chất khô, protein của các loại lá thuốc bỏng rất khác nhau, từ 2-31%. Mẫu lá K2 mặc dù có hàm lượng protein cao hơn các mẫu khác, nhưng hoạt độ ức chế tripixin (TIA), kimotripixin (KIA) thấp so với các mẫu lá K1 và K3 (bảng 1, hình 1).

Bảng 1

Hàm lượng chất khô, protein hoà tan, hoạt độ ức chế tripixin (TIA), ức chế kimotripixin (KIA) của lá bỏng

(Table 1. Content of dry substances, water soluble proteins and TIA, KIA of *Kalanchoe* leaves)

Mẫu lá	Hàm lượng chất khô (%)	Hàm lượng protein		TIA (*)	KIA (*)
		mg protein/100 g lá tươi	% chất khô		
K1	9,17	3,47	0,04	+++	+++
K2	2,61	5,79	0,22	+	+
K3	10,12	4,94	0,05	+++	+++

2. Hoạt độ kháng khuẩn của dịch ép lá bỏng

Tách riêng phần phiến lá, cuống lá của các mẫu K1, K2 (riêng K3 cuống lá quá mảnh nên chỉ cắt phần lá trên cuống lá) nghiền nát, ép lấy dịch, ly tâm thu dịch trong. Tiến hành thí nghiệm với 8 mẫu *S. aureus* phân lập từ bệnh phẩm. Kết quả cho thấy hầu hết các mẫu DE lá bỏng đều ức chế sinh trưởng các mẫu *S. aureus*, nhưng hoạt độ của DE phiến lá K1 có cao hơn các mẫu khác. Hoạt độ kháng khuẩn của dịch ép

cuống lá thấp hơn phiến lá (hình 2).

3. Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của DE lá bỏng K1 với các chủng VK chuẩn.

Kết quả trên bảng 2 cho thấy DE lá bỏng K1 có tác dụng ức chế sinh trưởng *P. aeruginosa* mạnh hơn *S. aureus*: trong cùng điều kiện, sau khi ủ với vi khuẩn ở các thời gian tương ứng, trong hầu hết các trường hợp, lượng vi khuẩn *P. aeruginosa* bị giảm lớn hơn *S. aureus* từ 10^8 đến 10^4 lần.

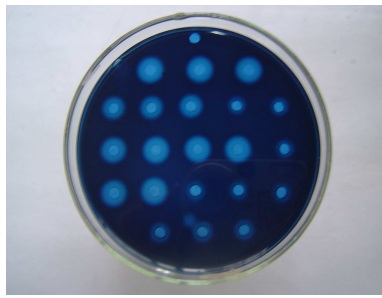
Bảng 2

Kiểm định hoạt tính kháng khuẩn của DE lá bỏng K1 với các chủng chuẩn bằng phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng (thực hiện tại Bộ môn Vi sinh vật Học viện Quân y)

(Table 2. Check on the antibacterial activity of *Kalanchoe* leaf juice by using dilution method in liquid medium (experiment was done at the Microbiology Department, Vietnam Military Medical University))

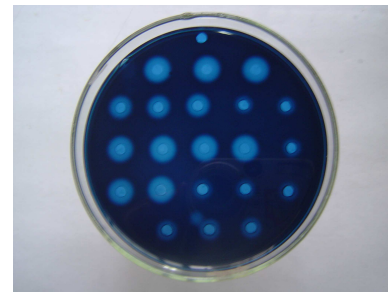
Chủng VK	Độ pha loãng của DE	Mức độ giảm nồng độ vi khuẩn (so với nồng độ chuẩn)		
		Sau 2h tiếp xúc	Sau 6h tiếp xúc	Sau 24 giờ tiếp xúc
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2	10 (lần)	10^3 (lần)	10^8
	4	10	10^2	10^4
	8	10	10^2	10^3
	16	10	10^2	10^3
<i>P. aeruginosa</i> CCVG-27652	2	10^5	10^8	10^8
	4	10^4	10^4	10^8
	8	10^3	10^3	10^5
	16	10^2	10^2	10^2

Ghi chú: nồng độ vi khuẩn ban đầu cho tất cả các mẫu thuốc là 10^8 VK/ml; DE lá bỏng K1 cô đặc 5 lần.



TI dịch ép lá bỏng K1, K2, K3

	3	2	1	
4	5	6	7	8
13	12	11	10	9
14	15	16	17	18
21	20	19		

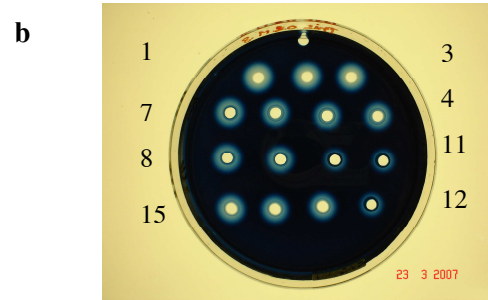
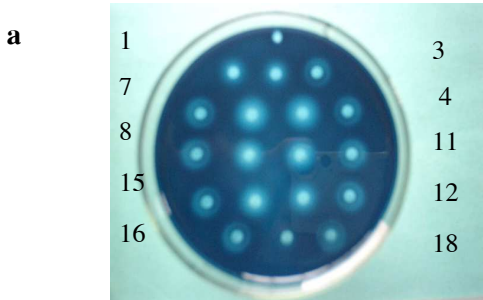


KI dịch ép lá bỏng K1, K2, K3

Hình 1. TIA và KIA của DE các mẫu lá bỏng

(Fig 1. Inhibitory activity against trypsin (TIA) and chymotrypsin (KIA) of *Kalanchoe* leaf juice)

Các giếng: 1, 2, 3: đối chứng, enzym (trypsin hoặc kimotripxin) + dung dịch đệm; 4-6: enzym + DE cuống lá K3; 7-9: enzym + DE phiến lá K3; 10-15: enzym + DE cuống lá, phiến lá K2; 16-18: enzym + DE cuống lá K1; 19-21: enzym + DE phiến lá K1. Để xác định TIA, KIA, dịch ép lá (DE) cô đặc 5 lần, xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Mỗi giếng có 62,5 µg enzym. (+): kim hãm 25%, như vậy mẫu K1 và K3 ức chế khoảng 75% lượng enzym có trong mỗi giếng.



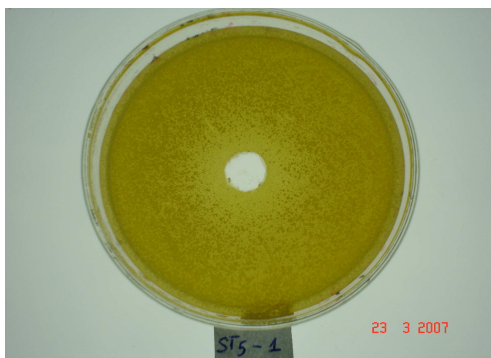
1, 2: PA ST2; 3, 4: PA ST2 + DE K1; 5, 6: PA ST3; 7, 8: PA ST3 + DE K1; 9, 10: PA ST4; 11, 12: PA ST4 + DE K1; 13, 14: PA ST5; 15, 16: PA ST5 + DE K1; 17: nước cất; 18: DE K1 - DE K1 đã cô đặc 5 lần.

1, 2, 3: PA *P. aeruginosa* (PA *P. au*); 4, 5, 6: PA *P. au* + K1; 7, 8, 9: PA *P. au* + K2; 10, 11, 12: PA *P. au* + K3; 13, 14, 15: PA *P. au* + K1Đ1.

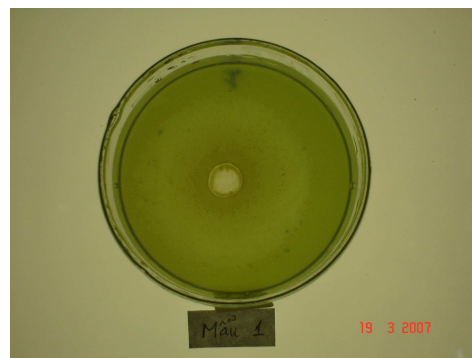
Hình 3. Tác dụng của dịch ép lá bỏng (K1) đến PA

của các mẫu vi khuẩn *S. aureus* (a) và PA của *P. aeruginosa* (b).

(Fig 3. Effect of Kalanchoe leaf (K1) juice on PA from *S. aureus* (a) and PA from *P. aeruginosa* (b))



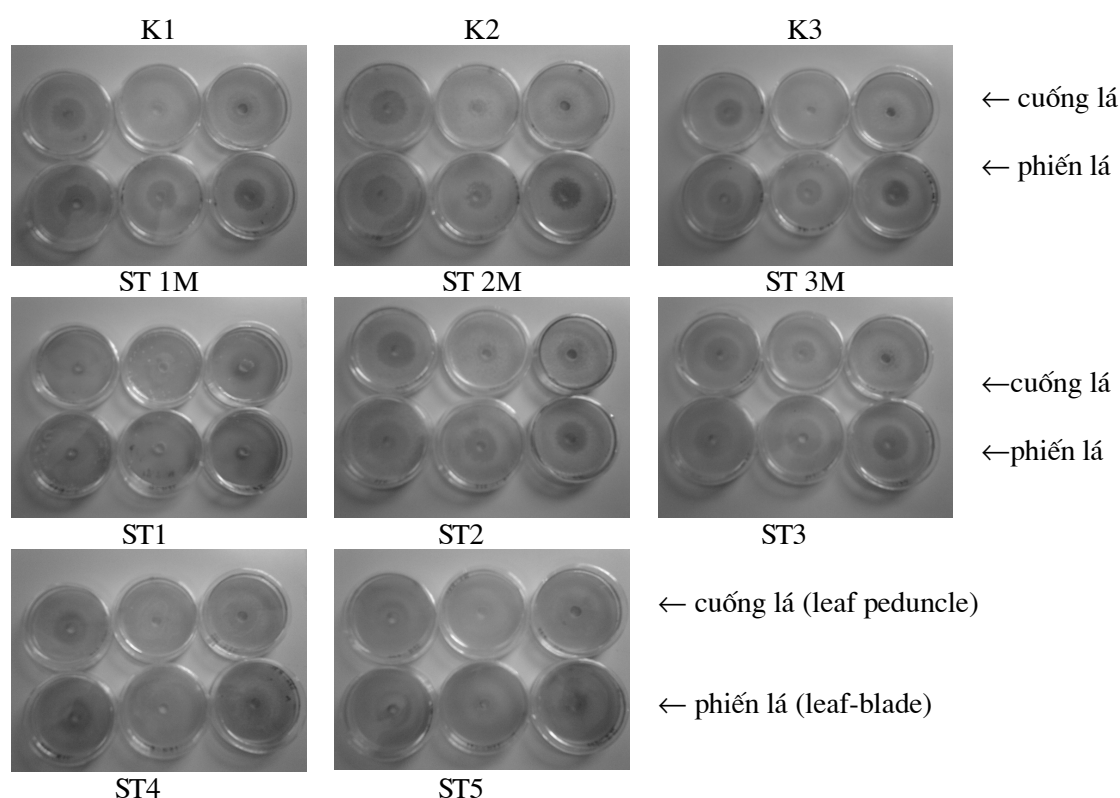
S. aureus ST5



P. aeruginosa

Hình 5. Hoạt tính kháng khuẩn của đỉnh 1 (Đ1) của K1 qua cột Sephadex G-25

(Fig 5. Antibacterial activity of peak 1 (D1) obtained after fractionating lyophilized K1 leaf juice on Sephadex G-25 column)



Hình 2. Hoạt độ kháng khuẩn của các mẫu lá bỏng

Fig 2. Antibacterial activity of the juice from leaves of K1, K2, K3.

Các chữ ghi dưới mỗi ô là kí hiệu các mẫu vi khuẩn. Trong mỗi ô của hình có 6 đĩa: hàng trên là DE cuống lá, hàng dưới là DE phiến lá của các mẫu K1, K2, K3 (theo thứ tự từ trái sang phải).

4. Thăm dò điều kiện xử lý vô trùng DE lá bỏng đến hoạt tính sinh học của nó

Để chuẩn bị chế phẩm vô trùng sử dụng trong thực tế, chúng tôi đã xử lý chế phẩm theo các cách khác nhau: đun sôi ở 100°C trong 30 phút hoặc khử trùng trong nồi hấp (autoclave) ở 121°C trong 30 phút và lọc qua màng lọc vô khuẩn Minisart 0,2 µm. Ở cả 2 mẫu xử lý nhiệt đều xuất hiện kết tủa trắng, ly tâm thu dịch trong để phân tích.

Kết quả cho thấy ở các điều kiện xử lý nhiệt này, hoạt độ kháng các mẫu vi khuẩn có giảm nhưng không nhiều. Tuy nhiên DE đã xử lý ở các điều kiện trên đều mất hoạt tính ức chế triptxin và kimotriptxin, kể cả khi xử lý với thời gian ngắn hơn (5, 10, 15 phút). Điều đó cho thấy các chất ức chế triptxin, kimotriptxin có trong lá bỏng không bền với nhiệt. Chỉ có mẫu lọc qua màng lọc vô khuẩn Minisart 0,2 µm giữ nguyên được cả hoạt độ kháng khuẩn, TIA và KIA, tiến hành lọc DE.

5. Thu nhận proteinaz của các mẫu vi khuẩn và nghiên cứu tác dụng của DE lá bỏng đến proteinaz của vi khuẩn

Để tìm hiểu thêm về vai trò các PI của DE lá bỏng đối với hoạt tính kháng khuẩn của nó, chúng tôi đã nuôi các mẫu vi khuẩn trong môi trường dịch thể, xác định PA của dịch môi trường theo thời gian nuôi cấy (16, 24, 40, 48 và 64 giờ), ở các pH khác nhau. Kết quả đã xác định được thời gian nuôi *S. aureus* cho PA cao là 16 - 24 giờ, đối với *P. aeruginosa* là 72 giờ, pH hoạt động thích hợp là 7,6.

Để tinh sạch sơ bộ enzym, tách enzym khỏi các chất phân tử thấp có trong môi trường nuôi vi khuẩn, đã sử dụng axeton với tỉ lệ thể tích 3:1 (axeton: dịch môi trường) để kết tủa enzym. Hòa tan kết tủa, thử tác dụng của DE lá bỏng K1 đến PA vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Kết quả cho thấy trong hầu hết các trường hợp, khi trộn với DE lá bỏng K1, vòng phân giải

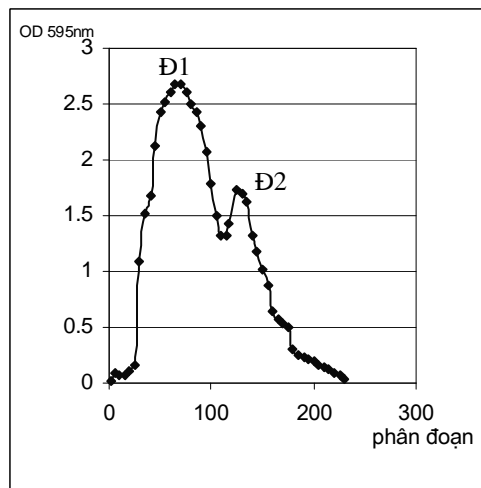
đều bé hơn đối chứng (thay DE bằng nước) (hình 3). Điều đó chứng tỏ DE có tác dụng ức chế PA của các mẫu ST5, 1M, 2M và 3M.

6. Sắc ký qua cột Sephadex G-25 chế phẩm đông khô DE lá bỏng K1.

Để chuẩn bị chế phẩm dễ bảo quản, chúng tôi đã tiến hành đông khô dịch ép, thu được chế phẩm bột khô. Từ 1kg lá nhận được từ 20-24 gam bột (bảng 3). Chế phẩm bột được sử dụng để sắc ký qua cột Sephadex G-25 và phân tích hoạt độ ức chế proteinaz.

Kết quả nghiên cứu đã nêu trên về ảnh hưởng của việc xử lý nhiệt đến hoạt tính sinh học của DE lá bỏng (mục II.4) cho thấy các chất có hoạt tính ức chế triptxin và kimotriptxin của DE không bền với nhiệt, hơn nữa ở nhiệt độ cao xuất hiện kết tủa trắng, như vậy, có thể chúng là các polypeptit phân tử lớn? Do đó chúng tôi đã sử dụng Sephadex G-25 để tiến hành sắc ký nhằm tách riêng các chất phân tử thấp có trong dịch ép. Xác định protein trong các phân đoạn bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm, nhận được 2 đỉnh (hình 4). Đỉnh 1 (Đ1) là đỉnh chính, chế phẩm bột khô của Đ1 được sử dụng để phân tích tiếp. Kết quả xác định cho thấy Đ1 có hoạt tính ức chế triptxin, kimotriptxin, PA của

vi khuẩn (bảng 4) và cũng có cả hoạt tính kháng *P. aeruginosa* phân lập từ mụn vết thương bỏng (hình 5).



Hình 4. Sắc ký đồ chế phẩm đông khô DE lá bỏng K1 qua cột Sephadex G-25
(Fig 4. Chromatogram of lyophilized K1 leaf juice preparation on Sephadex G-25 column)

Cột có kích thước 90 × 2 cm, cân bằng với dung dịch đệm Sorensen pH = 6,5. Thể tích mỗi phân đoạn 0,7 ml, tốc độ 20 ml/giờ.

Bảng 3

Hoạt độ ức chế proteinaz của chế phẩm đông khô DE lá bỏng

(Table 3. The inhibitory activity against proteinases of lyophilized *Kalanchoe* leaf juice preparations)

Mẫu lá bỏng	Trọng lượng lá (gam)	Trọng lượng bột nhận được sau đông khô (gam)	Protein của chế phẩm mg/g chế phẩm	TIA mIU/g chế phẩm	KIA mIU/g chế phẩm	Hoạt độ ức chế PA của <i>P.seudomonas</i> mIU/g chế phẩm
K1	1000	24,976	1,40	284,37	707,53	2027,0
K2	1000	20,590	2,81	180,90	635,0	1461,7
K3	1000	22,740	2,17	474,80	1428,0	3060,0
K1 qua G-25, Đ1		14,657	0,38 (a)	104,12 (a)	249,4 (a)	909,0 (a)

Ghi chú: (a) tính trên mg bột khô của Đ1.

Nếu tính hoạt độ ức chế mIU/ mg protein (hoạt độ riêng), ta thấy tất cả các chế phẩm đều có hoạt độ riêng đối với proteinaz của *P. aeruginosa* lớn hơn các proteinaz khác (bảng 4): có thể gấp 6-8 lần đối với triptxin, và 2-3 lần đối với kimotriptxin. Phải chăng proteinaz của vi khuẩn này là enzym đích của các chất ức chế

proteinaz (PI) lá bỏng? Như trên đã nói, proteinaz của nhiều vi khuẩn thường tham gia vào quá trình xâm nhiễm của chúng, kết quả trên cho phép giả thiết PI của lá bỏng là một trong những thành phần tham gia vào tác dụng diệt khuẩn, điều trị vết thương của lá bỏng.

**Hoạt độ ức chế riêng (mIU/mg protein) của các chế phẩm đông
khô đối với các proteinaz khác nhau**

(Table 4. Specific proteinase inhibitory activity (mIU/mg) of liophylized *Kalanchoe* leaf juice preparations)

Mẫu	Hoạt độ riêng (mIU/mg protein)			
	Tripxin	Kimotripxin	Proteinaz của <i>P. aeruginosa</i>	Proteinaz của ST5
K1	0,203	0,505	1,447	
K1Đ1	0,274	0,656	2,392	
K2	0,064	0,226	0,520	
K3	0,218	0,658	1,410	

III. KẾT LUẬN

1. Dịch ép (DE) của 3 mẫu lá bông đã nghiền cứu đều có hoạt tính kháng các mẫu *S. aureus* và *P. aeruginosa* phân lập từ bệnh phẩm, hoạt độ của lá K1 có lớn hơn các mẫu khác. Hoạt độ kháng khuẩn của cuống lá thấp hơn của phiến lá. Đông khô DE từ 1kg lá bông thu được từ 20 - 24 gam bột khô.

2. DE các mẫu lá bông có các chất ức chế tripxin, kimotripxin, proteinaz của *P. aeruginosa* và *S. aureus* phân lập từ bệnh phẩm.

3. Sắc ký chế phẩm đông khô K1 qua cột Sephadex G-25, nhận được 2 đỉnh, đỉnh 1 (Đ1) là đỉnh chính. Đ1 có hoạt tính kháng *P. aeruginosa*, ức chế tripxin, kimotripxin và proteinaz của *P. aeruginosa*.

4. Hoạt độ riêng (mIU/mg protein) của các chế phẩm bột khô K1, K2, K3 và Đ1 của K1 đối với proteinaz của *P. aeruginosa* phân lập từ bệnh phẩm đều lớn hơn đối với tripxin, kimotripxin từ 2 đến 8 lần. Từ đó giả thiết về vai trò của các chất ức chế proteinaz đối với tác dụng kháng khuẩn của lá bông.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Adenike K., Eretan OB**, 2004: J. Biochem.

Mol. Biol, 37(2): 229-233.

2. **Bradford M. M.**, 1976: Anal. Biochem., 72: 248.

3. **Ferreira A. C., Rosenthal D., Carvalho D. P.**, 2000: Food Chem, Toxicol, 38(5): 417-421.

4. **Hoàng Thu Hà, Phạm Thị Trân Châu**, 2006: Tạp chí Sinh học, 28(1): 75-80.

5. **Ibrahim T. et al.**, 2001: Immunopharmacol, 2(7): 875-883.

6. **Phạm Hoàng Hộ**, 1999: Cây cỏ Việt Nam. Nxb. Trẻ tp. Hồ Chí Minh.

7. **Phan Thị Hà, Đặng Xuân Nghiêm, Phạm Thị Trân Châu**, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 1086-1090. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

8. **Pietrova J. S., M. M. Wincjunajte**, 1966: Priklad. Biochim. I Microbiol., 2: 232 (tiếng Nga).

9. **Supratman U. et al.**, 2001: Phytochemistry, 58(2): 311-314.

10. **Võ Văn Chi**, 2000: Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nxb. Y học.

STUDY ON PROTEINASE INHIBITORS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COIRAMA (*KALANCHOE PINATA*) LEAF JUICE

DAO THI THUY, HOANG THU HA, PHAM THI TRAN CHAU

SUMMARY

As known, proteinases are involved in different living processes including infectious, inflammation process. Therefore study proteinase inhibitors in medicinal plants possess effect of treatment the mention above diseases might contribute to understanding their action mechanism.

Juice of fresh *Kalanchoe* leaves has been used effectively for treatment of various diseases including inflammation, skin ulcers, wound, burn. There were many publications about chemicals isolated from these leaves and their biological activities, but none of them concerning proteinase inhibitors.

This work deals with proteinase inhibitors (PIs) from *Kalanchoe* leaf juice and searching for their antibacterial activity and effect on proteinases isolated from *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Three *Kalanchoe* leaves differed from each other in their figures, designated as K1, K2, K3 were chosen for our study. The obtained results documented that: *Kalanchoe* leaf juice inhibited growth of all tested *S. aureus* samples isolated from pus of patients. However, the antibacterial activity of leaf - peduncle juice was lower than that of leaf-blade juice. Leaf juice of K1, K3 exhibited inhibitory activity against trypsin, chymotrypsin and proteinases isolated from *P. aeruginosa* and *S. aureus*. By fractionating the liophylized K1 leaf juice preparation on Sephadex G-25 column and measuring absorption at 280 nm of eluted fractions, two peaks on chromatogram were observed. The main peak 1 (D1) reduced proteolytic activity of trypsin, chymotrypsin and proteinases from *P. aeruginosa*. Peak 1 also inhibited growth of *P. aeruginosa*. Counting inhibitory specific activity (mIU/mg protein) of the liophylized juice preparations showed that the specific activity against proteinases from *P. aeruginosa* was higher than that against trypsin and chymotrypsin about 2 to 8 time. Thus, it was suggested that PI in leaf juice may play an important role in the antibacterial activity of K1 leaf juice.

Ngày nhận bài: 27-3-2007